

SVEU ILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATI KI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

UPOTREBA ZMIJSKIH TOKSINA U MEDICINI

THE USE OF SNAKE VENOM TOXINS IN MEDICINE

SEMINARSKI RAD

Martina Mavrovi
Preddiplomski studij biologije
(Undergraduate Study of Biology)
Mentor: doc.dr.sc. Zoran Tadi

Zagreb, 2010.

SADRŽAJ

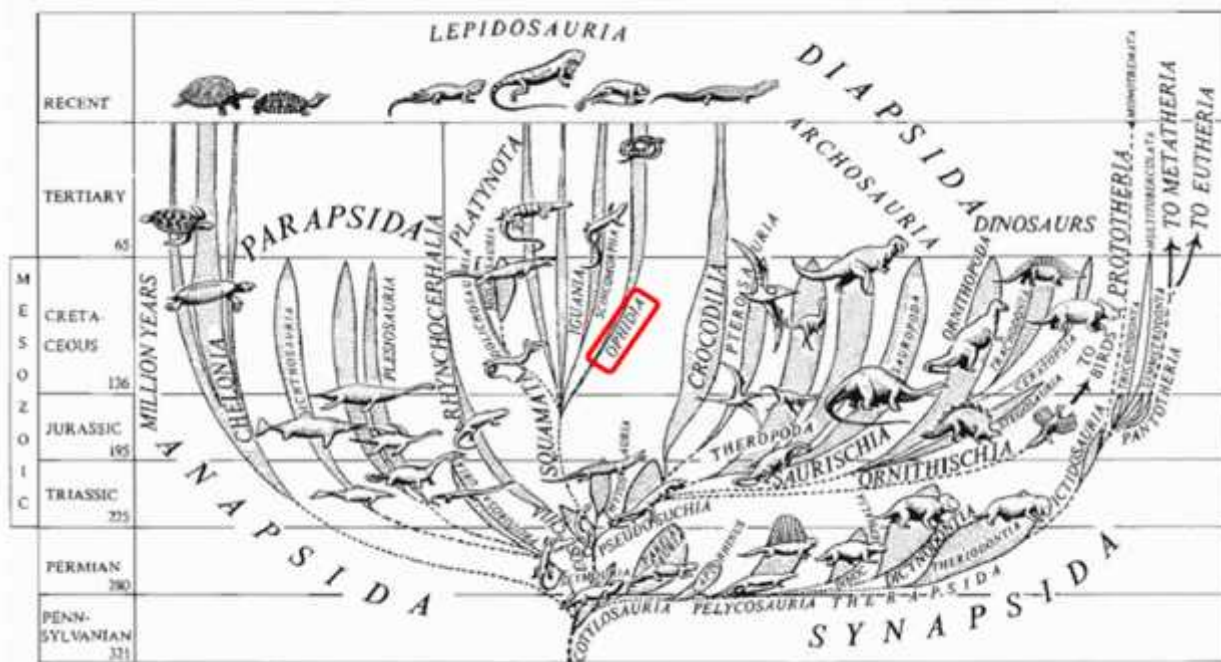
1.	UVOD.....	2
2.	BIOLOGIJA ZMIJA.....	4
3.	ZMIJE OTROVNICE.....	6
4.	ZMIJSKI OTROVI.....	8
4.1.	Toksi ni elementi otrova	9
5.	MEDICINSKA UPOTREBA TOKSINA.....	11
5.1.	Antivenini.....	11
5.2.	Lijekovi oblikovani prema toksinima.....	12
5.3.	Toksini u medicinskim istraživanjima.....	13
6.	SAŽETAK.....	15
7.	SUMMARY.....	15
8.	LITERATURA.....	16

1. UVOD

Do rekonstrukcije evolucijske povijesti zmija došlo se pomnim ispitivanjem fosilnih nalaza te usporedbom anatomije zmija i njihovih srodnika. Fosili zmija su rijetki jer su zmijski kosturi krhki i teško se okamenjuju.

Gmazovi su se razvili iz skupine drevnih vodozemaca poznate kao *Labyrinthodontia* (prvi se put javlja u Devonu, geološkom razdoblju iz ere Paleozoika koje je trajalo od prije 416 do prije 359,2 milijuna godina). Najstariji fosil za kojeg se definitivno može reći da je gmaz je *Hyolomimus* kojeg klasifikacija smješta u skupinu *Cotylosauria*. Prvi se put pojavljuje u Permu (geološko razdoblje Paleozoika koje je trajalo od prije 299 do prije 251 milijuna godina) i smatra se pretkom svih recentnih porodica gmazova.

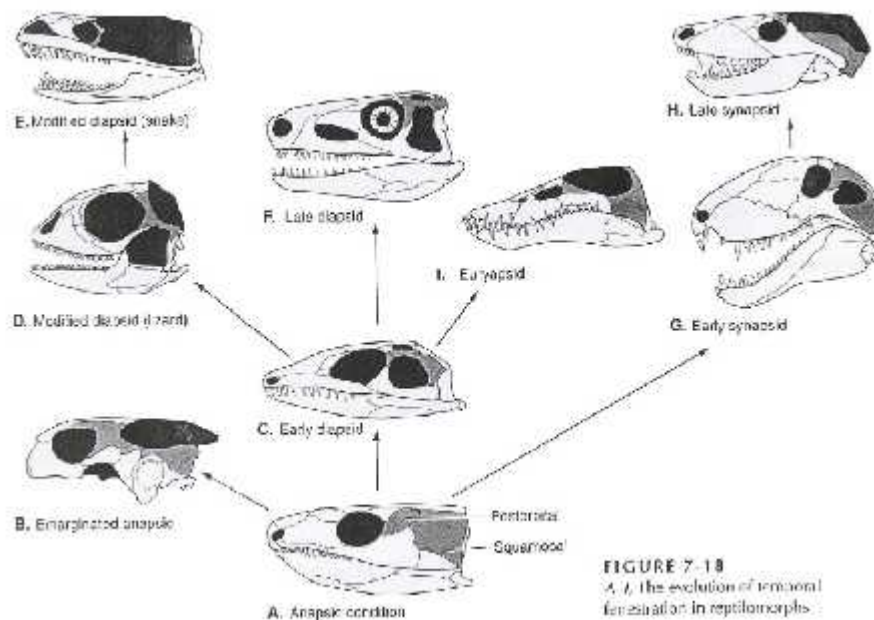
Cotylosauria daljnjom evolucijom divergiraju u tri različite skupine gmazova koje razlikujemo pomoću struktura na lubanji (postojanje otvora u temporalnom dijelu lubanje). (Slika 1.)



Slika 1. Evolucija gmazova od Perma do danas

(Young, J.Z., The Life of Vertebrates, Clarendon Press, Oxford, 1981)

Prvo se odvojila skupina *Anapsida*, koja nije imala niti jedan otvor u temporalnom dijelu. Predstavnici ove skupine preci su današnjih kornja a. Slijede a se odvaja skupina *Synapsida* koja u temporalnom dijelu lubanje ima jedan otvor. Predstavnici su preci današnjih sisavaca. Tre a skupina, *Diapsida*, ima dva otvora u temporalnom dijelu lubanje. Predstavnici te skupine razvili su se u dinosaure, a zatim u današnje guštere i zmije (Slika 2.).



Slika 2. Razvoj temporalnih otvora u ranih gmazova
(nepoznat izvor)

Evolucijska prednost koja je zmije odvojila od ostalih gmazova je izme u ostalog i mogu nost proizvodnje otrova koji zmija unosi ugrizom. Mogu nost stvaranja otrova zmije su razvile tijekom Miocena (geološko razdoblje Neogena koje je trajalo od prije 23.03 do prije 5.33 milijuna godina). Prije toga bismo zmije mogli svrstati u glomazne predatore koji su napadali iz zasjede i konstrikcijom usmr ivali svoju žrtvu. Promjenom klime otvorene livade zamjenjuju šume. Paralelno se razvijaju manje, brže zmije. Takve životinje teško bi svoju žrtvu mogle ugušiti konstrikcijom, pa su se kod njih razvili drugi mehanizmi imobilizacije plijena, kao što je stvaranje toksina.

U novije se vrijeme zmijski toksini koriste u lije enju. A. Calmete je prije oko 100 godina dokazao da je mogu e imunizirati životinju protiv zmijskog otrova i u initi ju otpornom na njega. Time je po ela era moderne protuotrovne seroterapije, kao i drugih medicinskih upotreba zmijskih toksina.

2. BIOLOGIJA ZMIJA

Zmije su gmazovi prekriveni ljuskama, bez nogu, sa izduženim cilindričnim tijelom koji pripadaju redu *Squamata*, podredu *Ophidia* (Ménez 2004).

Imaju sve značajke kopnenih kralješnjaka: kralježnicu, optjecajni, živani i probavni sustav, respiracijski i ekskretorni aparat te mišiće. Ektotermne su poput ostalih gmazova. Tjelesnu temperaturu održavaju različitim 'tipovima ponašanja' poput grijanja na sunanim površinama ili hlađenja zakopavanjem u zemlju (Ménez 2004).

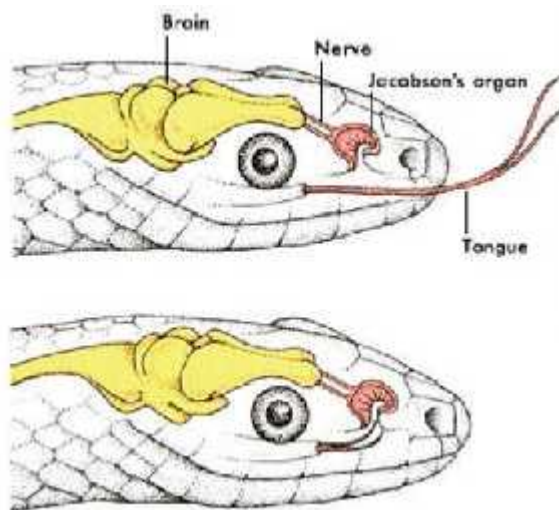
Oko 3000 postojećih vrsta zmija varira u rasponu veličina od 10 cm do 10 m dužine, koju dostižu samo rijetki primjerci. Kozmopolitski su rasprostranjene i morfološki prilagođene različitim staništima (Pough i sur. 2005).

Način kretanja zmija odražava morfološke razlike vezane uz stanište i način predacije. Kod lateralne undulacije zmijsko tijelo je u obliku slova 'S', sa više ili manje zavoja, od kojih svaki gura životinju naprijed. Rektilinearne kretanje koriste zmije teška tijela. Alterniraju i dijelovi tijela se odignu od tla i guraju naprijed pomoću rebrenih mišića. Koncertina kretanje koristi se u uskim prolazima, odgurivanjem od stijenki. Postrano kretanje koriste zmije vrhova podneblja (u pustinjama), valovitim kretanjama sa uporištem u 3 točke. Arborealne vrste kombiniraju različite tipove kretanja (Pough i sur. 2005).

Što se tiče hranjenja, zmije kao skupinu možemo nazvati mesojednim generalistima. Međutim, zasebne porodice i rodovi mogu biti specijalizirane poput vrsta koje se hrane isključivo truplima u raspadu. Čim god da se hranile, zmije svoj plijen ne žva u veću gutaju. To im omogućuje spoj izrazito fleksibilnih elemenata gornje i donje čeljusti. Plijen se najprije guta od glave, a kad dođe do jednaka snažni mišići i vrata ga potisnu prema želucu (Pough i sur. 2005).

Glavne značajke predatorstva u zmija jesu konstrikcija i otrov. Te tehnike omogućavaju savladavanje plijena uz vrlo maleni rizik od ozljede. Konstrikcija je karakteristična za pitone, udave i predstavnike porodice *Colubridae*. Plijen umire zbog nemogućnosti širenja ošita (ne može udahnuti), ali najprije zbog cirkulacijskog kolapsa. Zmije koje mogu injicirati otrov razvile su vrlo sigurnu metodu lova. Kontakt sa plijenom je sveden na minimum. Ovu tehniku lova primjenjuju zmije iz porodica *Viperidae*, *Elaphidae* i neke zmije porodice *Colubridae*. Pojedine su vrste razvile relativno sedentarni tip predacije, pa sakrivene čekaju plijen (Pough i sur. 2005).

Zmije posjeduju sva uobičajena osjetila (vid, miris, okus, dodir, sluh). Za zmije je karakteristično palucanje račvastim jezikom, koji im omogućuje 'mirisanje' okolnog prostora. Jezik hvata hlapljive molekule u zraku koje prepoznaje Jakobsonov (vomeronazalni) organ smješten na krovu usne šupljine (Ménez 2004) (Slika 3.).



Slika 3. Smještaj Jakobsonovog organa
(nepoznat izvor)

Pripadnici skupine udavki imaju receptore osjetljive na infracrvenu svjetlost. Ti su receptori smješteni u dubokim brazdama između nosnica i oka. Pomoću njih zmije 'vide' toplinu koju isijava tijelo toplokrvnih životinja, njihovog nestog plijena.

Vid je kod zmija manje naglašeno osjetilo. Iako njihova oka ne koriste cilijarne mišiće za akomodaciju, veći mišići šarenice tako da povećavaju tlak intraokularne tekućine. Poput većine gmazova zmije nemaju vanjsko uho. Srednje uho je također slabo razvijeno. Njihov rudimanarni slušni aparat detektira frekvencije od 100-1000 Hz.

Dio tijela koji je u izravnom dodiru sa tlom je osjetljiv na vibracije, tako da zmije putem vibracija tla i okolnog zraka mogu osjetiti da im se neka životinja približava.

Koža je suha i nepropusna, prekrivena ljuskama. U određenim vremenskim intervalima gornji rožnati sloj kože gmazovi presvlače, ali ne presvlače i ljuske.

U društvenom životu zmija koristi se cijeli spektar vizualnih, kemijskih, auditornih i taktilnih signala, s naglaskom na kemijske. Zmije se u komunikaciji najviše služe feromonima (Ménez 2004).

3. ZMIJE OTROVNICE

Zmije pripadaju koljenu *Chordata*, potkoljenu *Vertebrata*, razredu *Reptilia*, podrazredu *Squammata* te redu *Ophidia* (*Serpentes*). Nadporodica *Colubridea* sadrži porodice zmija: *Elapidae*, *Colubridae*, *Viperidae* i *Atracospididae*. Svaka od navedenih porodica posjeduje predstavnike koji mogu biti otrovni.

Postoji više metoda klasifikacije zmija. Sredinom 19. stoljeća predložena je klasifikacija na temelju denticije. Takva klasifikacija je jednostavna i često korištena (Ménez, 2004).

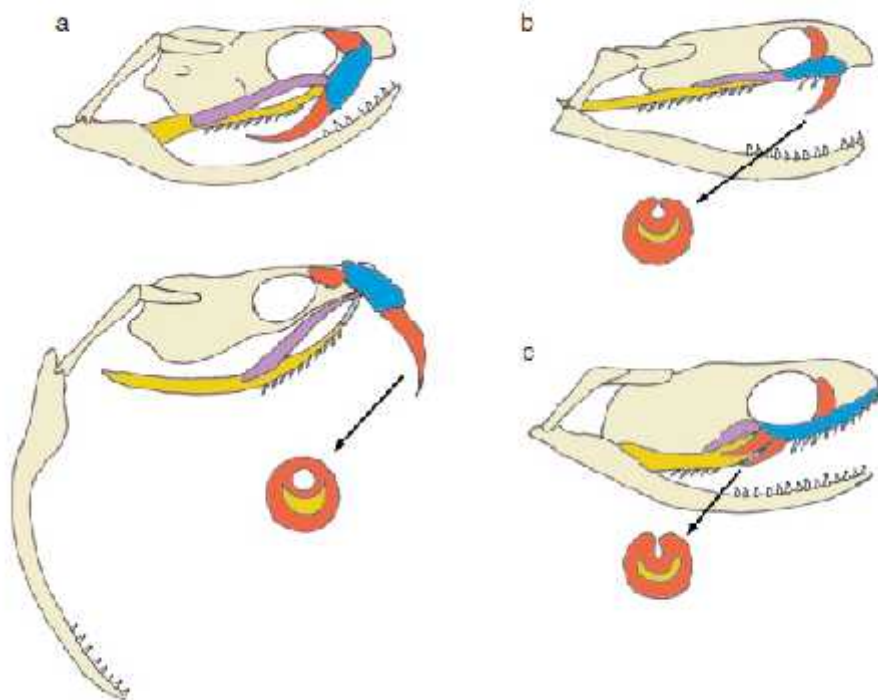
Podjela zuba kod zmija (Slika 4.):

1. Neotrovnice (*Aglypha*): svi su zubi iste veličine. Poredani su na gornjoj eljusti i nepne kosti i okrenuti prema natrag.
2. Otrovnice: dolazi do diferencijacije zuba gornje eljusti. Otrovnici zubi su tvrdi, krhki i oštri.
 - a) Žljebasti zubi: otrov protječe niz žlijeb
 - Prednježljebozubice (*Proteroglypha*): otrovni zubi se nalaze na prednjem dijelu gornje eljusti. Otrovi protječu niz žlijeb na zubu.
 - Stražnježljebozubice (*Opisthoglypha*): otrovni zubi smješteni straga na gornjoj eljusti. Otrovi protječu niz žlijeb u zubu.
 - b) Cjevasti zubi
 - Cijevozubice (*Solenoglypha*): otrov protječe kroz cijev u zubu. Cjevasti zubi su ujedno i jedini koji se nalaze na gornjoj eljusti.

Porodice *Viperidae* i *Atracospididae* spadaju u skupinu *Solenoglypha*. Uz brojne male zube duž nepne kosti, ove porodice posjeduju i dva cjevasta zuba koja provode otrov. Ti zubi mogu biti dugi i do 5 cm. Otrovnici zubi su u stanju mirovanja pognuti, a za vrijeme napada stoje uspravno.

Članovi porodice *Elapidae*, poput kobri i mambi, pripadaju prednježljebozubicama. One imaju par fiksnih zuba na prednjem dijelu gornje eljusti te nekolicinu malih zuba.

Otrovni pripadnici porodice *Colubridae* spadaju u skupinu stražnježljebozubica. Na stražnjem dijelu gornje eljusti nalaze im se otrovni zubi, a ispred njih imaju brojne zube.

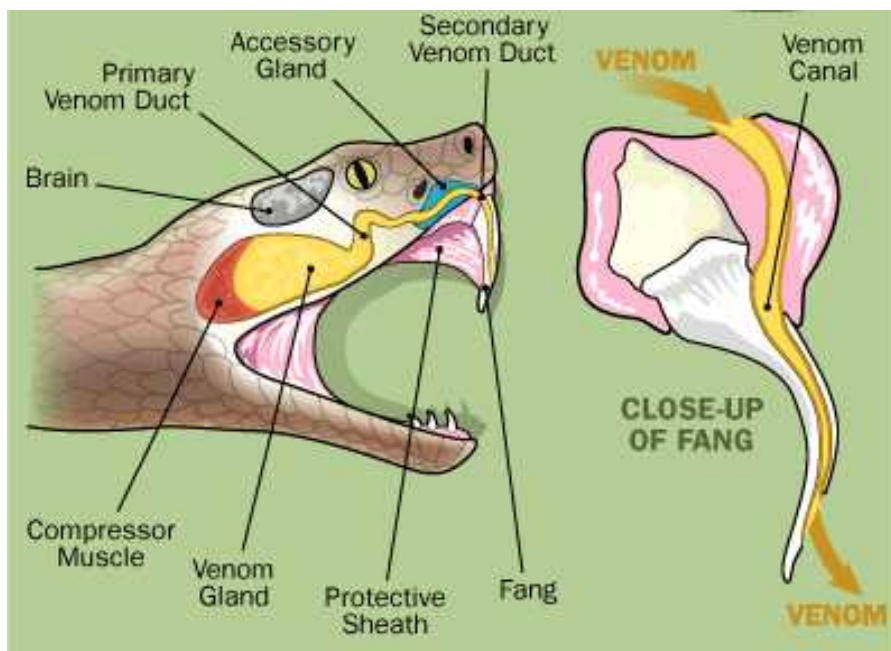


Slika 4. Podjela zuba kod zmija: a) porodica *Viperidae*, b) porodica *Elapidae*,
c) porodica *Colubridae*
(Ménez, A., The Subtle Beast, Taylor & Francis, USA, 2003)

4. ZMIJSKI OTROVI

Otrov je izlučevina koja je evoluirala prvenstveno radi lova na plijen (jedini izuzetak su neke tzv. kobre pljuvačice). Razvio se iz probavnih enzima. Tijekom evolucije uvelike se izmjenio od originalnog oblika. Nastaje u žlijezdama koje su analogne slinovnicama u ljudi i prenosi se kanalima do velikih maksilarnih zuba, koji su zbog toga nazvani otrovnim zubima. Otrovnice žlijezde imaju lumen i odvojen mišić za postizanje tlaka pri injiciranju otrova (Slika 5.).

Otrov je zapravo složena mješavina biološki aktivnih tvari koja ima dvije funkcije: paralizira žrtvu i započinje probavu.



Slika 5. Dijagram glave zmije otrovnice.

(www.howstuffworks.com)

4.1. Toksi ni elementi otrova

Toksini, jedna od osnovnih komponenata zmijskog otrova, najzaslužniji su njegov za letalni učinak. Biokemijskom analizom utvrđeno da proteini čine 90-95% suhe mase otrova. Ostatak čine neproteinski sastojci kao što su metali, lipidi, amini itd. Otrovi omogućuju brzo prodiranje toksina u ciljne organe. U tome im pomažu enzimi koji razgrađuju i razaraju pojedine organe i sustave organa žrtve. Zmijski se otrovi najčešće dijele na hemotoksine, neurotoksine i miotoksine.

1. Hemotoksini: izravno razaraju tkivo na mjestu ugriza i dalje od njega, utječu na krv i organe tako da razaraju krvne stanice, djeluju na sustav koagulacije krvi, a mogu oštetiti i srce, skeletne mišiće, bubrege i pluća.

Neki primjeri hemotoksina su:

- Citotoksini: enzimi koji uništavaju razne stanice. Mogu uzrokovati fatalne hemolize uništavanjem crvenih krvnih stanica.
- Serinske proteaze: enzimi koji stupaju u interakciju sa proteinima uključenim u hemostazu i fibrinolizu. Pretvaraju fibrinogen u ugruške fibrina.
- Metaloproteaze: enzimi koji uzrokuju teška krvarenja. Spriječavaju stvaranje ugruška.
- Mambini: spriječavaju stvaranje ugruška.
- Safarotoksini: djeluju kao snažni vazokonstriktori aorte i koronarnih arterija.

2. Neurotoksini: utječu na živani sustav izazivajući i pritom teže promjene u osjetilnim i motoričkim sustavima. Djeluju specifično na esencijalne biološke funkcije kao što su prijenos živčanog i mišićnog impulsa.

Neki primjeri neurotoksina su:

- α -neurotoksini (kurare oponašajući): blokiraju nikotinske receptore acetilkolina, čime spriječavaju prijenos živčanog impulsa do skeletnog mišića. Posljedica je paraliza.
- β -neurotoksini: presinaptički toksini koji spriječavaju otpuštanje acetilkolina. Posljedica je paraliza.
- K-neurotoksini: vežu se na nikotinske receptore. Uzrokuju paralizu.
- Fascikulini: inhibiraju acetilkolinesterazu (enzim zadužen za razgradnju acetilkolina). Njihovo djelovanje uzrokuje dugotrajno grčenje mišića.

3. Miotoksini: djeluju na mišino tkivo. Uzrokuju degeneracije i izlučivanje mioglobina u mokraću.

Iako postoji spomenuta podjela, nijedna zmija nema potpuno hemotoksičan, neurotoksičan, odnosno miotoksičan otrov nego posjeduje kombinaciju otrova. U koju ćemo je kategoriju zmiju svrstati, ovisi o količini pojedinih tvari koje prevladavaju u njezinu otrovu.

5. MEDICINSKA UPOTREBA TOKSINA

Krajem 17. stoljeća talijanski znanstvenik Francesco Redi otkriva da žuž kasta tekućina sakupljena iz zuba zmije djeluje letalno. Početkom 20. stoljeća otkriven je mehanizam prijenosa otrova u žrtvu. Načeno je i da su toksini neuinkoviti ako se gutaju, a visoko uinkoviti ako se ubrizgaju u žilu (Ménez 2004).

5.1. Antivenini

Albert Calmete je 1894. godine dokazao da je moguće imunizirati životinju protiv zmijskog otrova i uiniti je otpornom na njega. Time je počela era moderne protuotrovne seroterapije. On je priredio prvi protuotrovni serum i dokazao da bilo koji imunizirajuć i životinjski serum može spasiti i drugu životinju od ugriza iste zmije (Ménez 2004).

Antiserumi se obično priređuju hiperimunizacijom konja (mogu se koristiti i ovca, koza, kuni ...), npr. antiserum za otrov egretnuša je derivat konjskog seruma.

Postupak imunizacije:

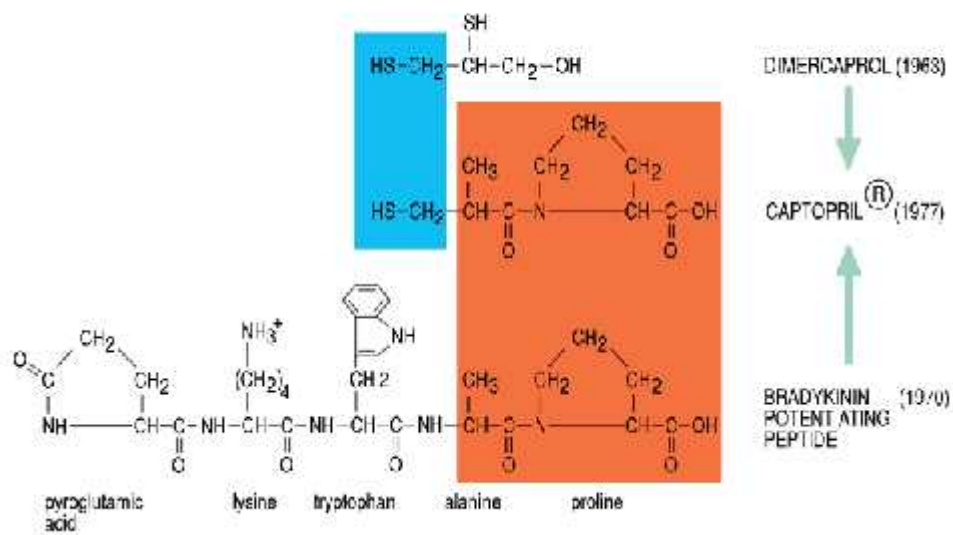
1. Ubrizgavanje malih doza otrova u životinju.
2. Doze se progresivno povećavaju kako jača obrambeni sustav životinje.
3. Uzorci krvi za pripremanje seruma (krvna plazma bez fibrinogena, dobiva se centrifugiranjem) uzimaju se nekoliko dana nakon injekcije završnih doza otrova koje se ubrizgavaju u životinju kad već stekne hiperimunost (2-3 puta na mjesec).

Životinjski serumi sadržavaju brojna protutijela za proteine koji su različiti od onih u otrovu. Zato se povećavaju i time povećavaju uinkovitost samog protuotrova.

5.2. Lijekovi oblikovani prema toksinima

Toksini se mogu koristiti u dizajniranju lijekova jer pružaju trodimenzionalni predložak za kreiranje malih molekula koje mogu oponašati djelovanje toksina. Ujedno su i veoma selektivni (Harvey i sur. 1998).

Komponente otrova netom izolirane ne mogu se koristiti kao lijek. Potrebno je odrediti kemijska svojstva ključna za djelovanje te komponente (Ménez 2004) (Slika 6.).



Slika 6. Peptid izoliran iz otrova zmijske *Bothrops sp.*, skupine označene crveno i plavo bile su ishodišne točke u razvoju lijeka.

(Prema Ménez, A., *The Subtle Beast*, Taylor & Francis, USA, 2003)

Prvi lijek sintetiziran od nekog peptida iz zmijskog otrova je *Captopril*®, važan pri liječenju povišenog tlaka. Sintetiziran je iz otrova vrste *Bothrops jararaca* (porodica *Viperidae*). Peptid iz otrova navedene vrste poboljšava kontrakcije glatkih mišića odgovornih za vazokonstrikciju i vazodilataciju time što povećava djelovanje hormona odgovornih za širenje stijenki krvnih žila (vazodilataciju). Djeluje i na inhibiranje prijelaza angiotenzina I u angiotenzin II (enzimi odgovorni za sužavanje stijenki krvnih žila, vazokonstrikciju), time se dodatno naglašava u inak vazodilataciju (Ménez 2004).

Toksini izolirani iz zmijskog otrova mogu sprječavati ili poticati stvaranje krvnih ugrušaka. Enzim batroxobin izoliran iz vrste *Bothrops sp.* (porodica *Viperidae*) izašao je na tržište pod nazivom *Reptilase*®. On oponaša djelovanje enzima trombina (pretvara tekući fibrin u fibrinska vlakna). Takvo djelovanje pomaže brzo stvaranje ugruška na mjestu ozljede žile. Injiciranje manjih doza toga enzima tijekom duljeg vremenskog perioda dovodi do formiranja fibrina i potiče stvaranje ugrušaka. Klasični antikoagulanti poput hirudina i heparina ne djeluju inhibitorno na batroxobin. *Reptilase*® se koristi u liječenju krvarenja tijekom operacija, te u urologiji i ginekologiji (Ménez 2004).

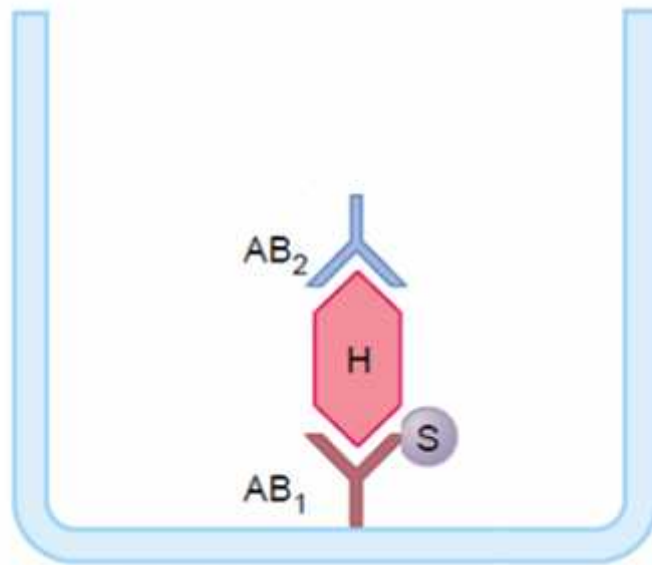
Isti enzim, batroxobin, koristi se i kao antikoagulant. Intravenozno (u samo žilu) ili subkutano (ispod kože) injiciranje batroxobina uklanja fibrinogen iz krvi te time sprječava trombozu, plućnu emboliju i anginu pectoris. Navedeni enzim, izoliran iz vrste *Calloselasma rhodostoma* (porodica *Viperidae*), već se koristi pod komercijalnim nazivom *Defibrase*® (Ménez 2004).

5.3. Toksini u medicinskim istraživanjima

Toksini izolirani iz zmijskog otrova korisni su u identifikaciji receptora vezanih uz pojedine bolesti. Otkriće acetilkolinskih receptora vezano je uz proučavanje djelovanja zmijskih toksina. Neki toksini su korisni u dijagnosticiranju bolesti poput, mijastenije gravis. To je neuromuskularna bolest koja nastaje zbog razaranja acetilkolinskih receptora. Podražaji se sa živca ne mogu prenijeti na miši koji zbog toga ostaje nekontrahiran. U istraživanju te bolesti bilo je važno prepoznati antitijela specifična za receptore (kod autoimunih bolesti tijelo stvara antitijela protiv tvari i tkiva normalno prisutnih u tijelu, u ovom slučaju receptora na neuromuskularnoj vezi). U tu svrhu sintetizirani su neurotoksini koji se vežu na acetilkolinske receptore označeni radioaktivnim bojama. Pomiješani su sa izoliranim acetilkolinskim receptorima. Zatim je taj kompleks, radioaktivni toksin-receptor, izložen antitijelima u krvnoj plazmi (*in vitro* uvjeti), čime je nastao veliki radioaktivni kompleks (toksin-receptor-antitijelo). (Slika 7.). Izolacija tog kompleksa omogućila je daljnja istraživanja, te je dala saznanja o koncentraciji antitijela u odnosu na receptore. Važna je činjenica da se navedeni postupak može primijeniti u istraživanju bilo koje autoimune bolesti.

Ispituje se i utjecaj zmijskih toksina na stanice raka. U središtu istraživanja su citotoksini i kemotoksini. Nigexin, citotoksini enzim iz otrova kobre, učinkovito uništava različite tipove tumorskih stanica. Problem nastaje zbog činjenice da su primarni cilj tog toksina crvene krvne stanice,

tj. on uzrokuje tešku hemolizu. I kada se hemoliti ka aktivnost selektivno ukloni nigexin zadržava sposobnost uništavanja tumorskih stanica. Za sada se ispituje samo u laboratorijskim uvjetima.



Slika 7. Primjer medicinskih istraživanja: tvar H (receptor) vezala se na AB₁(toksin); na taj se kompleks vezala tvar AB₂ (antitijelo). S je radioaktivna boja kojom je označen toksin (Prema Guyton i sur. 2006).

6. SAŽETAK

Zmije se unutar skupine gmazova po nju odvajati u Kredi (geološko razdoblje Mezozoika koje je trajalo od prije 136 do pred 65 milijuna godina). Mogu nost stvaranja otrova razvijaju tokom Miocena (geološko razdoblje Neogena koje je trajalo od prije 23.03 do prije 5.33 milijuna godina).

Prije stotinjak godina je dokazano da je mogu e imunizirati životinju protiv zmijskog otrova i u initi je otpornom na njega. Time je po ela era moderne protuotrovne seroterapije, kao i drugih medicinskih upotreba toksina iz zmijskog otrova.

Brojni lijekovi ve sintetizirani na temelju toksina iz otrova zmija, mnogi se istražuju. Toksini su zanimljivi u proizvodnji lijekova jer pružaju trodimenzionalni predložak za kreiranje malenih molekua koje mogu oponašati djelovanje samog toksina. Izoliranje i prou avanje pojedinih komponenata zmijskog otrova utrli su put ka boljem razumijevanju patofiziologije trovanja, a time i pridonjeli poboljšanju lije enja raznih bolesti.

7. SUMMARY

Snakes have started to diverge from the reptiles in Cretaceous (a geologic era of the Mesozoic which lasted from 136 million years ago until 65 million years ago). They have developed the possibility of producing venom in Miocene (a geologic era of the Neogene, which lasted from 23.03 million years ago until 5.33 million years ago).

One hundred years ago it was proved possible to immunise an animal against snake venom, and make it resistant to the venom. With that event started the era of modern serotherapy, as well as other medicinal uses of snake venom toxins.

Numerous drugs have already been synthesised based on toxins from snake venom, and numerous are still under research. Toxins are of interest in drug design because they provide a three-dimensional template for the creation of small molecules which can mimic the effects of the toxin. The isolation and study of snake venom components has paved the way for a deeper understanding of the pathophysiology of envenomings, as well as opened a possibility to improve therapeutic modalities.

8. LITERATURA

1. Guyton, A.C., Hall, J.E., Textbook of Medical Physiology, 11th edition, Elsevier Saunders, 2006.
2. Ménez, A., The Subtle Beast, Taylor & Francis, USA, 2003.
3. Pough, F.H., Janis, C.M. i Heiser, J.B., Vertebrate Life, 7th edition, Prentice Hall, 2005.
4. Young, J.Z., The Life of Vertebrates, Clarendon Press, Oxford, 1981.
5. Zug, G.R., Vitt, L.J., Caldwell, J.P., Herpetology, 2nd edition, Academic Press, 2001.
6. Harvey, A.L., Bradley, K.N., Cochran, S.A., Rowan, E.G., Pratt, J.A., Quillfeldt, J.A., Jerusalinsky, D.A., 1998. What can toxins tell us for drug discovery?, *Toxicon*, **11**, 1635-1640.
7. www.howstuffworks.com